

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 642 329**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 01221**

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : B 01 J 13/02; A 61 K 7/00, 9/50; A 23 P 1/04.

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 31 janvier 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOP « Brevets » n° 31 du 3 août 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIOETICA, Société Anonyme.* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Marie-Christine Levy; Marie-Christine An-  
dry; Alain Huc; Chantal Buffevant.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Utilisation de solutions d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes pour la fabrication de microcapsules, micro-  
capsules ainsi réalisées, procédés de fabrication de telles microcapsules et compositions cosmétiques ou pharma-  
ceutiques ou alimentaires en contenant.

⑤7 L'invention concerne des microcapsules à paroi mixte  
d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés ainsi que  
des procédés de fabrication de celles-ci.

Selon l'invention, les microcapsules sont caractérisées en ce  
qu'elles comprennent une paroi mixte d'atélocollagène et de  
glycosaminoglycannes réticulés, de préférence la proportion  
des glycosaminoglycannes par rapport à l'atélocollagène est  
comprise entre 18 et 50 % en poids. Ces microcapsules  
peuvent être fabriquées soit par un procédé mettant en œuvre  
une réticulation interfaciale soit encore par une extrusion à  
écoulement laminaire disloquée par des vibrations en goutte-  
lettes individuelles tombant dans un bain de réticulation.

Ces microcapsules sont biocompatibles grâce à la présence  
d'atélocollagène qui présente la plupart des propriétés intéres-  
santes du collagène, à savoir une antigénicité très faible ainsi  
qu'une biodégradabilité parfaite. Elles sont donc particulière-  
ment appropriées pour la fabrication de compositions cosméti-  
ques, pharmaceutiques ou alimentaires.

FR 2 642 329 - A1

Utilisation de solutions d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes pour la fabrication de microcapsules, microcapsules ainsi réalisées, procédés de fabrication de telles microcapsules et compositions cosmétiques ou pharmaceutiques ou alimentaires en contenant.

05

La présente invention concerne essentiellement l'utilisation de solutions d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes pour la fabrication des microcapsules, des microcapsules ainsi  
10 préparées, des procédés de fabrication de ces microcapsules ainsi que des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires les contenant.

On sait que pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques, de nombreux chercheurs travaillent à la mise au point  
15 d'encapsulation de substances actives. Parmi les effets recherchés pour une telle mise en oeuvre, on peut citer notamment l'amélioration de la biodisponibilité, la protection du principe actif dans une formule finie, la protection du principe actif dans l'organisme pour éviter notamment sa dégradation dans l'estomac, la libération  
20 différée, ou la libération lente pour effet prolongé.

Cette encapsulation peut être réalisée en incorporant ces principes actifs dans des microcapsules pour leur introduction dans des produits cosmétiques, des préparations pharmaceutiques ou des  
25 produits alimentaires destinés à diverses voies d'administration telles que la voie orale, la voie parentérale, l'application sur la peau et les muqueuses.

Dans l'état de la technique antérieure, on a déjà proposé diverses techniques pour la fabrication de microcapsules à l'aide de polymères synthétiques. Ces dernières substances permettent des  
30 fabrications industrielles aisées mais les microcapsules obtenues sont en général difficilement biodégradables et, lorsqu'elles le sont, elles donnent naissance à des produits de dégradation qui peuvent être toxiques, ou dont la toxicité n'est pas connue.

Ainsi, les travaux de recherche se sont orientés vers la  
35 réalisation de microcapsules à l'aide de substances naturelles biocompatibles et biodégradables. Dans ce cadre, les chercheurs ont

utilisés des protéines. On peut se reporter par exemple au document FR-A-2 444 497 MARS ainsi que le document FR-A-2 527 438 CNRS.

Dans ces deux documents, la technique utilisée comporte trois étapes :

- 05           a) l'émulsification d'une solution aqueuse alcaline d'une protéine au sein d'un solvant organique non miscible à l'eau ;
- b) la réticulation interfaciale des vésicules de l'émulsion grâce à un agent de réticulation qui est en général un dichlorure d'acide organique ; et enfin
- 10           c) l'isolation et le lavage des microcapsules obtenues grâce à des solvants appropriés.

Dans le premier document, la membrane est constituée uniquement de protéine, tandis que dans le second document elle est composée d'un mélange de protéines et de polyholosides.

- 15           Un autre procédé connu sous le nom de procédé EXTRAMET mis en oeuvre par la société EXTRAMET permet d'obtenir des microcapsules en coupant mécaniquement à l'aide d'un vibreur un écoulement laminaire réalisé par extrusion d'une solution de matériau polymérisable à travers une buse, ce qui provoque la formation de
- 20           vésicules ou gouttelettes qui peuvent être ensuite rigidifiées par séchage ou par réticulation dans un bain contenant un agent réticulant dans lequel chutent les vésicules ou gouttelettes. Cette technique peut être appliquée à des polymères synthétiques ou à des protéines. L'encapsulation d'une substance active hydrosoluble dans
- 25           une capsule protéique sera obtenue par dissolution dans la solution de protéines avant extrusion. Si la substance active est de forme huile ou bien si elle est en solution dans l'huile, elle sera encapsulée grâce à une coextrusion avec la solution protéique qui se trouve à l'extérieur du flux laminaire.

- 30           On observera que dans aucun des documents de l'état de la technique antérieure relatifs à la fabrication de microcapsules, et en particulier dans les deux documents précités 2 444 497 et 2 527 438, bien que les procédés soient appliqués à des protéines d'une manière générale, il n'est jamais cité ou fait allusion à
- 35           l'emploi de collagène.

Les inventeurs de la présente invention ont essayé d'utiliser le collagène dans les procédés décrits dans les documents précédents ainsi qu'en utilisant la technique EXTRAMET.

05 Ces expériences se sont soldées par un échec car ces techniques ne sont pas applicables au collagène. En effet, pour obtenir une réticulation efficace, il est nécessaire de préparer des solutions de collagène dans un milieu fortement tamponné à des pH supérieurs ou égaux à 5,5.

10 Or, le collagène habituel, c'est-à-dire le collagène natif, précipite en partie et il est alors très difficile d'obtenir des mélanges homogènes. L'émulsion avec un liquide organique ne peut pas être réalisée, de sorte que les procédés décrits dans les documents précédents FR-A-2 444 497 et FR-A-2 527 438 ne peuvent être mis en oeuvre. Il en est également de même avec la technique  
15 d'extrusion laminaire EXTRAMET dans laquelle il est impossible d'obtenir un flux constant avec un mélange hétérogène.

La présente invention a donc pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de fabriquer des microcapsules dont la paroi  
20 comprend au moins en partie du collagène ou un produit de type collagénique présentant les mêmes propriétés que le collagène, avec les procédés de la technique antérieure.

La présente invention a encore pour but de résoudre le problème technique ci-dessus énoncé, avec l'utilisation de procédés  
25 de fabrication extrêmement simples, utilisables à l'échelle industrielle, et permettant en outre de régler à volonté la dimension des microcapsules, en particulier dans une plage de dimensions allant de moins de 1 à 3 000  $\mu$ .

Selon la présente invention, on a découvert de manière  
30 totalement inattendue que les problèmes techniques énumérés ci-dessus pouvaient être résolus d'une manière extrêmement aisée, si l'on utilisait comme matière première une solution d'atélo-collagène et de glycosaminoglycannes.

C'est sur la base de cette découverte totalement  
35 inattendue pour l'homme de l'art que la présente invention a été réalisée, ce qui représente un progrès technique déterminant pour

l'homme de l'art compte tenu que l'atélocollagène présente la plupart des propriétés intéressantes du collagène, à savoir une antigénicité très faible ainsi bien sûr qu'une biodégradabilité parfaite.

05           Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes pour la fabrication de microcapsules. De préférence, ces microcapsules contiennent un principe actif, notamment cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

10           Selon un deuxième aspect, la présente invention a pour objet des microcapsules, caractérisées en ce qu'elles comprennent une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés.

15           La proportion de glycosaminoglycannes par rapport à l'atélocollagène peut varier de 15 à 50 % en poids. Ces glycosaminoglycannes peuvent être avantageusement ceux décrits dans le cadre des procédés de fabrication décrits ci-après. Il en est de même des autres caractéristiques énoncées pour le procédé et qui se retrouvent dans les microcapsules elles-mêmes.

20           La présente invention concerne encore, selon un troisième aspect, un procédé de fabrication de microcapsules, caractérisé par les étapes successives suivantes :

          a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;

25           b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes de manière à former une solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes ;

30           c) on forme une émulsion de la solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes comme phase dispersée dans un liquide hydrophobe formant la phase continue, dans lequel l'atélocollagène et/ou les glycosaminoglycannes sont essentiellement insolubles ;

35           d) on ajoute à l'émulsion résultante une solution d'un agent réticulant comportant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes acylables de l'atélocollagène et des glycosaminoglycannes de manière à réaliser une réaction de réticulation interfaciale entre l'atélocollagène et les glycosaminoglycannes et

L'agent réticulant pour former des microcapsules dont la paroi est une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés.

05           Avantageusement, ce procédé comprend encore l'étape complémentaire de séparer les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué un ou plusieurs lavages.

10           La présente invention concerne, selon un quatrième aspect, un procédé de fabrication de microcapsules contenant une huile non miscible à l'eau, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

          a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;

15           b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes de manière à former une solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes ;

          c) on forme une émulsion de la phase huileuse contenant un agent réticulant comme phase dispersée dans la solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes formant la phase continue ;

20           d) l'ensemble est maintenu sous agitation pendant le temps nécessaire pour obtenir une réticulation interfaciale suffisamment importante conduisant à des microcapsules dont la paroi est une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés ;

25           e) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué un ou plusieurs lavages.

30           Selon un autre aspect, la présente invention fournit encore un procédé de fabrication de microcapsules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

          a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;

          b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes ;

35           c) on prépare un bain de réticulation contenant un agent de réticulation approprié ;

d) on réalise une extrusion laminaire de la solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes à travers une buse d'extrusion tout en soumettant l'écoulement laminaire à des vibrations pour disloquer l'écoulement laminaire en gouttelettes individuelles ;

e) on fait tomber les gouttelettes individuelles dans ledit bain de réticulation en obtenant ainsi des microcapsules par réticulation de l'atélocollagène et des glycosaminoglycannes ; et

f) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué un ou plusieurs lavages.

On notera que les étapes a) et b) ci-dessus sont communes aux étapes a) et b) du procédé de réticulation interfaciale, de sorte que tout ce qui a été dit précédemment à ce sujet s'applique à ce second procédé par extrusion.

Selon encore un autre aspect, la présente invention fournit encore un procédé de fabrication de microcapsules pour l'encapsulation d'une phase huileuse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène et une solution de glycosaminoglycannes ;

b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes ;

c) on dissout l'agent réticulant dans la phase huileuse à encapsuler ;

d) on réalise à travers une buse d'extrusion une coextrusion laminaire de la solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes et de la phase huileuse à encapsuler, tout en soumettant l'écoulement laminaire à des vibrations pour disloquer l'écoulement laminaire en gouttelettes individuelles ;

e) on fait tomber les gouttelettes individuelles dans un bain aqueux et maintenu sous agitation ;

f) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué plusieurs lavages par l'eau.

Selon une caractéristique avantageuse des procédés de fabrication selon l'invention, l'agent réticulant est un dichlorure d'acide ou un anhydride d'acide ou un acide carboxylique di- ou poly-basique. Selon une caractéristique préférée, l'agent réticulant est choisi parmi le chlorure de téréphtaloyle, le chlorure d'acide phtalique, le chlorure d'acide sébacique, le chlorure d'acide succinique, le chlorure d'un acide tricarboxylique comme l'acide citrique ou un anhydride d'acide comme l'anhydride succinique.

Comme liquide hydrophobe, dans lequel l'atélocollagène et/ou les glycosaminoglycannes sont insolubles, on peut utiliser tout solvant décrit dans les documents précédents. De préférence, on utilisera le cyclohexane, ou le chloroforme.

Selon une autre variante de réalisation des procédés selon l'invention, on réalise le mélange atélocollagène-glycosaminoglycannes en introduisant la solution de glycosaminoglycannes dans la solution d'atélocollagène.

Selon un mode de réalisation particulier, la solution de glycosaminoglycannes est préparée par mise en solution du glycosaminoglycanne, de préférence obtenu à l'état sec, par exemple en ayant été lyophilisé, dans une solution aqueuse dont le pH est réglé de sorte qu'après mélange avec la solution d'atélocollagène, le pH du mélange soit compris entre 5,5 et 10. De préférence, la solution aqueuse est une solution tampon basique. Cette solution tampon basique peut être une solution aqueuse de soude ou de préférence une solution aqueuse d'un tampon basique obtenu par neutralisation d'un acide faible avec une base forte, comme par exemple le carbonate de sodium, l'acétate de sodium ou le citrate de sodium, ou dans des solutions de phosphates de sodium et de potassium.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la concentration en glycosaminoglycannes par rapport à la concentration en atélocollagène est de 15 à 50 % en poids.

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la concentration en glycosaminoglycannes dans la



solution de glycosaminoglycannes est de 0,5 à 4 %, encore mieux de 0,5 à 2 %, et encore de préférence est voisine de 1 %.

05 Selon une autre caractéristique des procédés de l'invention, la solution d'atélocollagène est une solution aqueuse d'atélocollagène ayant une concentration comprise entre 0,5 et 2 % en poids. Cette solution d'atélocollagène peut être obtenue selon l'invention par dissolution de fibres d'atélocollagène dans une solution aqueuse légèrement acide.

10 Selon un mode de réalisation particulier, ces fibres d'atélocollagène sont mises en solution dans de l'acide acétique 0,1 M.

Selon un autre mode de réalisation particulier des procédés selon l'invention, l'atélocollagène est obtenu par digestion enzymatique de collagène.

15 Selon une variante de réalisation particulière, les glycosaminoglycannes utilisés selon l'invention sont choisis parmi les glycosaminoglycannes de structure choisis parmi le groupe consistant du chondroïtine-4-sulfate, du chondroïtine-6-sulfate, du dermatane-sulfate, de l'héparane-sulfate, du kératane-sulfate ;  
20 ainsi que de l'héparine et ses dérivés.

On peut introduire dans la solution aqueuse d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes un ou plusieurs principes actifs souhaités à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion, en particulier une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique,  
25 pharmaceutique ou alimentaire.

En particulier, dans la technique d'extrusion précitée, on peut réaliser une extrusion de la substance à encapsuler incorporée à l'intérieur du flux laminaire d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes destinés à constituer la paroi des micro-  
30 capsules.

Dans le cas où la phase huileuse est la phase encapsulée, il est possible d'incorporer une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire à l'état de solution de suspension ou d'émulsion dans cette phase huileuse.

35 En particulier, dans la technique d'extrusion précitée, on peut réaliser une coextrusion de la substance active dissoute,

en suspension ou sous forme émulsionnée dans la phase huileuse, à l'intérieur du flux laminaire d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes destinés à constituer la paroi des microcapsules.

05 Enfin, selon un septième aspect, la présente invention concerne encore une composition cosmétique ou une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des microcapsules à paroi mixte atélocollagène-glycosaminoglycannes réticulés. De préférence, ces microcapsules contiennent au moins en partie un principe actif, en particulier un principe actif  
10 cosmétique ou un principe actif pharmaceutique.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée  
15 de l'invention. Dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

En outre, l'exemple 5 sera décrit en relation avec la figure unique annexée représentant schématiquement un appareil de fabrication de microcapsules selon la technique d'extrusion d'un écoulement laminaire EXTRAMET.  
20

#### EXEMPLE 1 selon l'invention

Dans cet exemple, on fabrique des microcapsules ayant un diamètre moyen de 20  $\mu$ m renfermant un principe actif hydrosoluble, la vitamine C.  
25

##### a) Préparation du collagène déréticulé ou atélocollagène

La peau de veau fraîchement abattu est soumise à épilation chimique dans un bain contenant 3 % de sulfure de sodium et 4 % de chaux, la proportion étant de 100 g de peau pour 200 cm<sup>3</sup> de solution. Le derme est alors isolé du reste de la peau par une  
30 opération de refendage grâce à une scie tournante à ruban.

Le tissu obtenu est broyé et extrudé à travers une grille comportant des trous de 4 mm. Le broyat est alors mis en contact pendant 3 semaines avec un lait de chaux saturé à raison de 1 kg pour 4 l de solution. La peau ainsi traitée est séparée du  
35

surnageant par une centrifugation en continu sous une accélération de 2 000 g à l'aide d'une décanteuse tournant à 4 000 tour/min. Le culot est ensuite soumis à deux lavages à l'eau courante dans une cuve inox sous agitation lente à raison de 1 kg pour 4 l de bain. 05 Le broyat est alors soumis à deux traitements du tampon phosphate pH 7,8 (21,7 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 0,78 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dans les mêmes conditions que pour le lavage à l'eau. Le culot est alors lavé par deux bains d'eau désionisée et stérile. Le broyat obtenu est placé dans une solution d'acide acétique (0,5 g/l, pH 3,4) à raison de 10 1 kg pour 20 l de bain. Après 5 minutes d'agitation, le surnageant est séparé du culot par décantation en continu selon la technique précédente. Le collagène est alors précipité par le surnageant par addition de chlorure de sodium sec dans une proportion de 10 % environ par rapport au bain. Après décantation par gravité, les 15 fibres obtenues sont dialysées contre de l'eau désionisée et stérile à l'aide de membranes de dialyse, de préférence formées par des boyaux dont le seuil de coupure est compris entre 6 000 et 8 000 daltons.

#### b) Préparation du chondroïtine-4-sulfate

20 Des cloisons nasales d'agneau débarrassées des tissus musculaires et adipeux sont hachées et broyées par extrusion à travers une grille comportant des trous de 4 mm ; le broyat est placé pendant 24 heures à une température de 6°C dans un tampon de chlorure de potassium (11,8 g/l de KCL, 78,8 mg/l de cystéine, ETDA 25 180 mg/l) renfermant 1 % de papaïne "MERCK". La proportion étant de 130 g de broyat pour 1 l de tampon.

Le surnageant est séparé du culot par centrifugation en continu à l'aide d'une décanteuse tournant à 4 000 tour/min. Au surnageant sont alors ajoutés 40 g/l d'acide trichloracétique. Le 30 précipité est éliminé par centrifugation en continu selon la technique précédente. Le surnageant est neutralisé à l'aide de soude en pastille. Le mélange est alors dialysé contre de l'eau désionisée et stérile à l'aide de boyaux dont le seuil de coupure est compris entre 6 000 et 8 000 daltons. La solution dialysée est 35 lyophilisée. Le chondroïtine-4-sulfate est obtenu à l'état sec.

c) Préparation de la solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8

L'atélocollagène sous forme de fibre provenant des boyaux de dialyse est mis en solution dans une solution aqueuse d'acide acétique 0,1 M de manière à obtenir une concentration d'atélocollagène de 3,2 % qui est dilué deux fois par une solution aqueuse tampon basique de chondroïtine-4-sulfate dont le tampon a été réalisé avec du carbonate de sodium, dont le volume et la concentration sont tels que les concentrations finales du mélange homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate sont les suivantes :

- atélocollagène.....	1,6 %
- chondroïtine-4-sulfate.....	0,6 %
- carbonate de sodium anhydre.....	4,8 %
- parahydroxybenzoate de méthyle..	0,4 %
- eau désionisée.....	le solde.

Le pH de l'ensemble est ajusté à 9,8 par l'acide chlorhydrique concentré. On prépare 2 kg de cette solution.

d) Préparation de l'agent réticulant

400 g de chlorure de téréphtaloyle sont broyés dans un mortier. Ils sont ajoutés à 8 l d'un mélange d'esters d'acides gras disponibles dans le commerce sous la dénomination commerciale DRAGOXAT<sup>®</sup> vendu par la société allemande DRAGOCO. L'ensemble est agité par agitation mécanique.

e) Emulsification

Dans une cuve inox réfrigérée, on introduit 300 ml d'agent émulsifiant Span 85<sup>®</sup> vendu par ICI Company ainsi que 5 700 ml de cyclohexane. L'ensemble est agité pendant 10 minutes par un système agitateur Ultra Turax<sup>®</sup> tournant à 7 200 tour/min (rpm).

La solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate, dans laquelle on a dissous 0,2 % de vitamine C, est alors versée dans la cuve.

f) Réticulation

La solution d'agent réticulant est ajoutée à l'émulsion obtenue, qui est maintenue sous agitation. Cinq minutes après, la

vitesse de rotation de l'agitateur est réduit de 10 % et l'agitation est poursuivie pendant 25 minutes supplémentaires.

On sépare les microsphères obtenues grâce à une décan-  
teuse type Robatel <sup>®</sup> de chez ROBATEL, Lyon, France, tournant à  
05 1 000 tour/min.

g) Lavage

Les microcapsules collagéniques obtenues peuvent être  
lavées cinq fois avec 1 500 ml du mélange d'esters d'acides gras  
précité Dragoxat <sup>®</sup> et elles sont séparées de la suspension dans les  
10 mêmes conditions que précédemment. 1,9 kg de microcapsules sont  
obtenues, elles peuvent être mises en suspension par exemple dans  
des gels de Carbopol <sup>®</sup> ou de collagène.

EXEMPLE 2 selon l'invention

Fabrication de microcapsules de diamètre moyen de 400 µ renfermant  
15 un pigment insoluble le DC RED 30, en suspension dans la phase  
aqueuse.

a) Préparation de la solution d'atélocollagène et de  
chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8.

10 kg de cette solution sont préparés comme décrit à  
20 l'exemple 1. Le colorant DC RED 30 en poudre est introduit à une  
concentration de 1 % dans la préparation maintenue sous agitation.

b) Préparation de l'agent réticulant

1,8 kg de chlorure de téréphtaloyle sont broyés dans un  
mortier et sont placés dans 40 l d'un mélange d'esters d'acides  
25 gras Dragoxat <sup>®</sup>. L'ensemble est agité pendant 30 minutes.

c) Emulsification

Dans une cuve inox de forme cylindrique sont introduits  
1 050 ml d'agent émulsifiant Span 85 <sup>®</sup> (ICI Company) et 29 l de  
cyclohexane. Dans le mélange agité mécaniquement, on verse la  
30 solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate  
contenant le colorant. L'ensemble est agité quelques minutes pour  
obtenir l'émulsion.

d) Réticulation

La solution d'agent réticulant telle que préparée à  
35 l'exemple 1 est ajoutée à l'émulsion maintenue sous agitation.  
L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes.

Les microcapsules obtenues sont récupérées par décantation comme décrit à l'exemple 1.

e) Lavage

05 On peut effectuer quatre lavages à raison de 10 l de Dragoxat<sup>®</sup> pour 10 kg de microsphères qui sont récupérés par décantation naturelle. Il est procédé à un cinquième lavage avec la même quantité de Dragoxat<sup>®</sup> mais, dans ce cas, les microcapsules sont séparées du bain par décantation à l'aide de la décanteuse Robatel<sup>®</sup> tournant à 1 000 tour/min (rpm).

10 Pour 1 kg de solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes de départ, on obtient environ 900 g de microcapsules. Comme précédemment, celles-ci peuvent être mises en suspension par exemple dans un gel de Carbopol<sup>®</sup> ou de collagène.

EXEMPLE 3

15 Fabrication de microcapsules de diamètre moyen 50 µm renfermant de l'huile d'olive émulsionnée dans la phase aqueuse

a) Préparation de la solution d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8

20 On prépare 2 kg de cette solution comme décrit à l'exemple 1.

b) Préparation de l'agent réticulant

On incorpore 400 g de chlorure de téréphtaloyle à 8 l de DRAGOXAT<sup>®</sup> dans les conditions décrites à l'exemple 1.

25 c) Réalisation d'une émulsion primaire d'huile d'olive dans la solution d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate

400 ml d'huile d'olive sont émulsionnés dans 2 kg de solution d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate par agitation mécanique pendant 3 minutes, à l'aide d'un système agitateur Ultra Turax tournant à 7 500 tour/min (rpm).

30 d) Emulsification

L'émulsion primaire obtenue est dispersée dans 6 l d'un mélange préparé avec 5 700 ml de DRAGOXAT<sup>®</sup> et 300 ml de Span 85<sup>®</sup>, par agitation mécanique pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur RAYNERI<sup>®</sup> tournant à 1 500 tour/min (rpm).

e) Réticulation

La solution d'agent réticulant est ajoutée à l'émulsion obtenue, maintenue sous l'agitation précédente. L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes.

05

f) Lavage

Les microcapsules obtenues peuvent être lavées

- deux fois avec 1 500 ml de DRAGOXAT<sup>®</sup> (cf. exemple 1),

- puis une fois avec 1 500 ml d'un mélange éthanol-eau 1:1 v/v renfermant 1 % d'émulsion Tween 20<sup>®</sup> v/v,

10

- puis deux fois à l'eau,

2,1 kg de microcapsules sont obtenus.

EXEMPLE 4 selon l'invention

Fabrication de microcapsules de diamètre moyen 50  $\mu$  renfermant une huile de saumon

15

a) Préparation de la solution d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8

On prépare 9 kg de cette solution comme décrit à l'exemple 1.

b) Préparation d'huile de saumon à encapsuler

20

On dissout 150 ml de chlorure de sébaçoyle dans 3 l d'huile de saumon.

c) Emulsification et réticulation

Dans 9 kg de la solution d'atélocollagène-chondroïtine-4-sulfate agitée mécaniquement dans une cuve comme décrit à l'exemple 1, on ajoute les 3 l d'huile de saumon contenant l'agent réticulant. L'ensemble est maintenu sous agitation pendant 1 heure.

25

d) Lavage

Les microcapsules récupérées par décantation naturelle sont placées dans un bain aqueux d'un volume de 9 l. Quatre lavages sont effectués dans les mêmes conditions. On obtient 2,8 kg de microcapsules qui peuvent également être mises en suspension par exemple dans des gels de Carbopol<sup>®</sup> ou de collagène.

30

EXEMPLE 5 selon l'invention

Fabrication de microcapsules de diamètre moyen 400  $\mu$  renfermant de l'huile d'onagre

35

a) on prépare la solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8 comme décrit à l'exemple 1. On prépare 2 kg de cette solution homogène.

b) Préparation du bain de réticulation

05 On dissout 350 g de chlorure de téréphtaloyle dans 5 l d'huile d'onagre. L'ensemble est agité pendant 30 minutes.

c) Coextrusion et réticulation des microcapsules

Pour ce faire, on utilise l'appareil Extramet schématisé à la figure unique annexée.

10 Cet appareil comprend essentiellement une buse d'extrusion 10 permettant de réaliser une coextrusion par la présence de deux orifices concentriques alimentés séparément par deux conduits d'alimentation 12, 14 servant par exemple respectivement à l'alimentation en solution d'atélocollagène-glycosaminoglycannes selon l'invention depuis un réservoir 16, et un principe  
15 actif par exemple de l'huile d'onagre depuis un réservoir de principe actif 18. A cette buse 10, est associé un dispositif vibreur 20 commandé par des moyens de commande 22. Cet appareil comprend également un bain réticulant 24 disposé à distance sous la  
20 buse 10 dans lequel est disposée la solution d'agent réticulant 25.

Cet appareil comprend également une électrode 26 à extrémité 28 hélicoïdale disposée concentriquement à l'écoulement du flux laminaire 30 coextrudé de la buse 10 de manière à séparer les gouttelettes générées par le vibreur 20, pour éviter une  
25 coalescence de ces gouttelettes. On peut également prévoir un dispositif de stroboscopie par flash 32 pour observer visuellement les gouttelettes ainsi générées tombant dans le bain de réticulation 25.

30 Le débit de la solution homogène d'atélocollagène et du glycosaminoglycane présents dans le réservoir 16 est le même que celui de l'huile d'onagre présente dans le réservoir 18, constituant le principe actif, et est de 800 ml/h. La fréquence de vibration du vibreur 20 est de 125 kHz.

35 Les gouttelettes 34 générées par le vibreur 20 à partir de l'écoulement laminaire réalisé dans la buse de coextrusion 10 sont reçues dans 1 l de bain de réticulation 25 maintenu sous



agitation grâce à un barreau magnétique. Le bain est renouvelé toutes les 30 minutes.

On peut prévoir de manière classique sur les conduites 12, 14 d'alimentation de la buse 10 des filtres 36, 38 ainsi que des vannes 40, 42. On peut véhiculer les divers liquides dans les conduites 12, 14 par mise sous pression des réservoirs 16, 18 grâce à des conduits d'alimentation appropriés 44, 46.

#### d) Lavage

Les microcapsules obtenues par réticulation des goutte-  
lettes dans le bain réticulant 25 sont lavées cinq fois avec une solution aqueuse à 1 % de dodécylsulfate de sodium et récupérées par décantation naturelle entre chaque lavage comme décrit à l'exemple 1. Après ce traitement, les microcapsules sont récupérées par flottation.

1 kg de solution d'atélocollagène et de glycosamino-  
glycannes permet d'obtenir environ 1,300 kg de microsphères contenant l'huile d'onagre.

Avec des microcapsules ayant un diamètre moyen de 300  $\mu$ m et plus, on peut réaliser la protection de principes actifs cosmétiques dans un produit fini. On peut obtenir une rupture immédiate des microcapsules à la surface de la peau avec laquelle les membranes s'intègrent parfaitement, ce qui entraîne un très bon toucher cosmétique.

Avec des microcapsules ayant un diamètre moyen de 50  $\mu$ m comme obtenu à l'exemple 1, on obtient une intégration aisée dans le stratum cornéum à partir duquel le principe actif est relargué.

A l'aide de pigments insolubles, ces microcapsules peuvent être colorées, ce qui donne un aspect visuel agréable et original.

#### 30 EXEMPLE 6 selon l'invention

Fabrication de microcapsules de diamètre moyen 400  $\mu$  renfermant de l'huile de saumon

a) Préparation de la solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate en milieu tamponné à pH 9,8

On prépare 2 kg de cette solution homogène comme décrit à l'exemple 1.

b) Préparation d'huile de saumon à encapsuler

On dissout 100 ml de chlorure de sébaçoyle dans 2 l d'huile de saumon.

c) Coextrusion et réticulation des microcapsules

05 On réalise la coextrusion et la réticulation des microcapsules dans les mêmes conditions que celles décrites à l'exemple 4 sauf, en ce qui concerne les débits qui sont de 1,2 l/h pour la solution homogène d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate et de 1 l/h pour l'huile de saumon.

10 Dans cette variante, il n'y a plus de bain de réticulation, la réticulation ayant eu lieu lors de la coextrusion et de la formation des gouttelettes.

d) Réception et lavage des microcapsules

15 Les microcapsules sont reçues dans un bain aqueux de 5 l maintenu sous agitation. Les microcapsules sont lavées quatre fois par le même bain et elles sont récupérées par décantation. On obtient 2 kg de microcapsules.

20 Pour une utilisation dans des compositions pharmaceutiques, ces microcapsules permettent lors d'un emploi par voie orale de réaliser un masquage du goût du principe actif, ainsi qu'une protection dans l'estomac ou un effet différé grâce à une gastrorésistance qui peut être obtenue par une réticulation appropriée.

25 On peut également réaliser des compositions destinées à diverses voies d'administration telles que la voie orale, la voie parentérale, l'application sur la peau et les muqueuses.

30 La présente invention concerne encore d'une manière générale un procédé de préparation d'une composition cosmétique, pharmaceutique, ou alimentaire, caractérisé en ce qu'on incorpore au moins en partie des microcapsules à paroi mixte atélocollagène-glycosaminoglycannes réticulés dans lesquelles on a de préférence encapsulé au moins en partie une substance présentant un intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

Ces microcapsules permettent également la protection de substances fragiles telles que les huiles essentielles susceptibles d'entrer dans la composition des aliments.

D'autres utilisations de ces microcapsules apparaîtront  
05 clairement à l'homme de l'art.

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes pour la fabrication de microcapsules qui, de préférence, contiennent un principe actif, notamment cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.
2. Microcapsules, caractérisées en ce qu'elles comprennent une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés.
3. Microcapsules selon la revendication 2, caractérisées en ce que la proportion de glycosaminoglycannes par rapport à l'atélocollagène peut varier de 15 à 50 % en poids.
4. Microcapsules selon la revendication 2 ou 3, caractérisées en ce que les glycosaminoglycannes sont choisis parmi les glycosaminoglycannes de structure choisis parmi le groupe consistant du chondroïtine-4-sulfate, du chondroïtine-6-sulfate, du dermatane-sulfate, de l'héparane-sulfate, du kératane-sulfate ; ainsi que de l'héparine et ses dérivés.
5. Procédé de fabrication de microcapsules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
  - a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;
  - b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes de manière à former une solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes ;
  - c) on forme une émulsion de la solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes comme phase dispersée dans un liquide hydrophobe formant la phase continue, dans lequel l'atélocollagène et/ou les glycosaminoglycannes sont essentiellement insolubles ;
  - d) on ajoute à l'émulsion résultante une solution d'un agent réticulant comportant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes acylables de l'atélocollagène et des glycosaminoglycannes de manière à réaliser une réaction de réticulation interfaciale entre l'atélocollagène et les glycosaminoglycannes et l'agent réticulant pour former des microcapsules dont la paroi est

une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés.

05 6. Procédé de fabrication de microcapsules contenant une huile non miscible à l'eau, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;

10 b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes de manière à former une solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes ;

c) on forme une émulsion de la phase huileuse contenant un agent réticulant comme phase dispersée dans la solution d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes formant la phase continue ;

15 d) l'ensemble est maintenu sous agitation pendant le temps nécessaire pour obtenir une réticulation interfaciale suffisamment importante conduisant à des microcapsules dont la paroi est une paroi mixte d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes réticulés ;

20 e) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué plusieurs lavages par l'eau.

7. Procédé de fabrication de microcapsules, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

25 a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène, et une solution de glycosaminoglycannes ;

b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes ;

c) on prépare un bain de réticulation contenant un agent de réticulation approprié ;

30 d) on réalise une extrusion laminaire de la solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes à travers une buse d'extrusion tout en soumettant l'écoulement laminaire à des vibrations pour disloquer l'écoulement laminaire en gouttelettes individuelles ;

e) on fait tomber les gouttelettes individuelles dans ledit bain de réticulation en obtenant ainsi des microcapsules par réticulation de l'atélocollagène et des glycosaminoglycannes ; et

05 f) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué un ou plusieurs lavages.

8. Procédé de fabrication de microcapsules encapsulant une phase huileuse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

10 a) on prépare séparément une solution d'atélocollagène et une solution de glycosaminoglycannes ;

b) on mélange la solution d'atélocollagène avec la solution de glycosaminoglycannes ;

15 c) on dissout un agent réticulant dans la phase huileuse à encapsuler ;

d) on réalise à travers une buse d'extrusion une coextrusion laminaire de la solution homogène d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes et de la phase huileuse à encapsuler, tout en soumettant l'écoulement laminaire à des vibrations pour  
20 disloquer l'écoulement laminaire en gouttelettes individuelles ;

e) on fait tomber les gouttelettes individuelles dans un bain aqueux maintenu sous agitation ; et

25 f) on sépare les microcapsules par tout moyen approprié, notamment par décantation naturelle après avoir éventuellement effectué plusieurs lavages par l'eau.

9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'agent réticulant est un dichlorure d'acide ou un anhydride d'acide ou un acide carboxylique di- ou poly-basique.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que  
30 l'agent réticulant est choisi parmi le chlorure de téréphtaloyle, le chlorure d'acide phtalique, le chlorure d'acide sébacique, le chlorure d'acide succinique, le chlorure d'acide tricarboxylique comme l'acide citrique ou un anhydride d'acide comme l'anhydride succinique.

35 11. Procédé selon l'une des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que le liquide hydrophobe précité, dans lequel

l'atélocollagène et/ou les glycosaminoglycannes sont insolubles, est le cyclohexane ou le chloroforme.

12. Procédé selon l'une des revendications 5 à 11, caractérisé en ce qu'on réalise le mélange atélocollagène-glycosaminoglycannes en introduisant la solution de glycosaminoglycannes dans la solution d'atélocollagène.

13. Procédé selon l'une des revendications 5 à 12, caractérisé en ce que la solution de glycosaminoglycannes est préparée par mise en solution du glycosaminoglycanne, de préférence obtenu à l'état sec, par exemple en ayant été lyophilisé, dans une solution aqueuse dont le pH est réglé de sorte qu'après mélange avec la solution d'atélocollagène, le pH du mélange soit compris entre 5,5 et 10 ; cette solution aqueuse est de préférence une solution tampon basique.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la solution tampon précitée est choisie parmi une solution aqueuse de soude ou une solution aqueuse d'un tampon obtenue par neutralisation d'un acide faible avec une base forte, comme par exemple le carbonate de sodium, l'acétate de sodium ou le citrate de sodium, les phosphates de sodium et de potassium.

15. Procédé selon l'une des revendications 9 à 14, caractérisé en ce que la concentration en glycosaminoglycannes par rapport à la concentration en atélocollagène est de 15 à 50 % en poids.

16. Procédé selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé en ce que la concentration en glycosaminoglycannes dans la solution de glycosaminoglycannes est de 0,5 à 4 %, encore mieux de 0,5 à 2 %, et encore de préférence est voisine de 1 %.

17. Procédé selon l'une des revendications 8 à 16, caractérisé en ce que la solution d'atélocollagène est une solution aqueuse d'atélocollagène ayant une concentration comprise entre 0,5 et 2 % en poids.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la solution d'atélocollagène est obtenue par dissolution de fibres d'atélocollagène dans une solution aqueuse légèrement acide, telle que de l'acide acétique 0,1 M.

19. Procédé selon l'une des revendications 5 à 18, caractérisé en ce que les glycosaminoglycannes sont choisis parmi les glycosaminoglycannes de structure choisis parmi le groupe consistant du chondroïtine-4-sulfate, du chondroïtine-6-sulfate, du dermatane-sulfate, de l'héparane-sulfate, du kératane-sulfate ; ainsi que de l'héparine et ses dérivés.

20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce qu'on peut introduire dans la solution aqueuse d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes un ou plusieurs principes actifs souhaités à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion, en particulier une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce qu'on introduit dans la phase huileuse dispersée à encapsuler une ou plusieurs substances d'intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion.

22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce qu'on peut réaliser une extrusion de la substance à encapsuler incorporée à l'intérieur du flux laminaire d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes destinés à constituer la paroi des microcapsules.

23. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'on réalise une coextrusion de la substance active dissoute, en suspension ou sous forme émulsionnée dans la phase huileuse, à l'intérieur du flux laminaire d'atélocollagène et de glycosaminoglycannes destinés à constituer la paroi des microcapsules.

24. Composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend des microcapsules à paroi mixte atélocollagène-glycosaminoglycannes réticulés qui, de préférence, contiennent au moins en partie une substance présentant un intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, telles que destinées à l'une des revendications 2 à 4 ou telles qu'obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 23.



25. Procédé de préparation d'une composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, caractérisé en ce qu'on incorpore au moins en partie des microcapsules à paroi mixte atélocollagène-glycosaminoglycannes réticulés, dans lesquelles on a de préférence encapsulé au moins en partie une substance présentant un intérêt cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

10

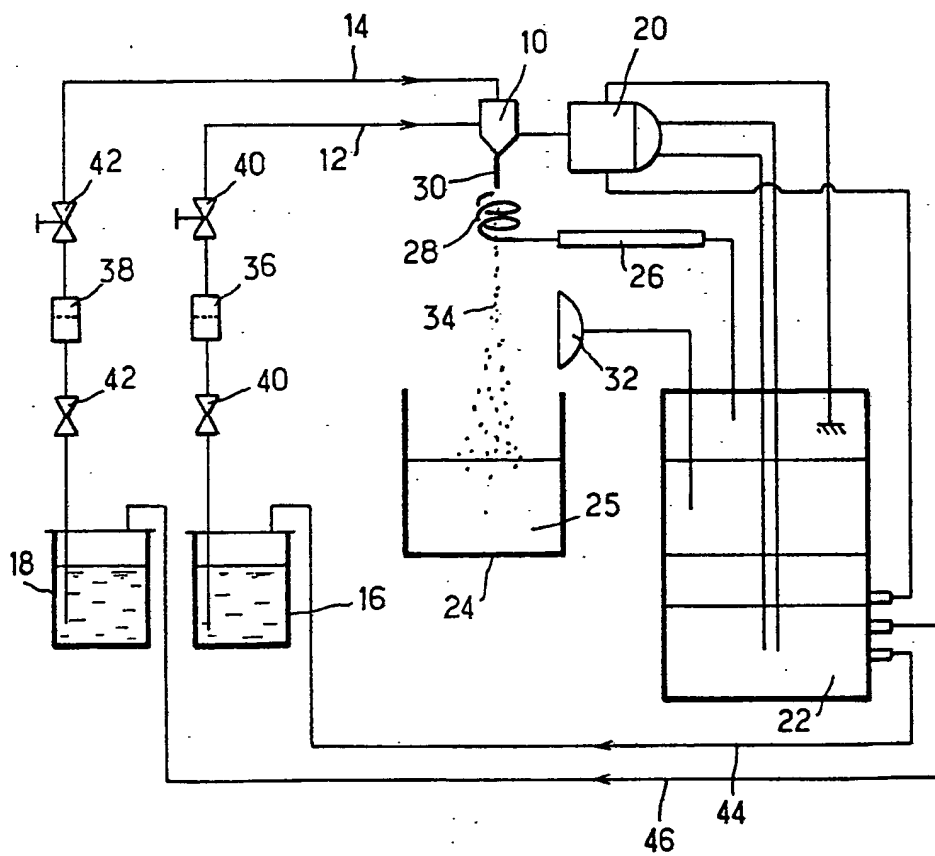
15

20

25

30

35



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**